

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平2-131569

⑮ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)5月21日

C 12 M 1/00

B

8717-4B

C 12 N

15/00

B

8717-4B

5/00

B※

8515-4B

審査請求 未請求 請求項の数 11 (全8頁)

⑬ 発明の名称 マイクロチャンバプレートおよび粒子判別方法ならびに粒子処理装置および細胞処理装置

⑯ 特 願 昭63-283601

⑰ 出 願 昭63(1988)11月11日

⑱ 発 明 者 河 村 喜 雄 東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内

⑲ 発 明 者 田 中 伸 司 東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内

⑳ 発 明 者 佐 藤 一 雄 東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内

㉑ 出 願 人 株式会社日立製作所 東京都千代田区神田駿河台4丁目6番地

㉒ 代 理 人 弁理士 小川 勝男 外1名

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

マイクロチャンバプレートおよび粒子判別方法
並びに粒子処理装置および細胞処理装置

2. 特許請求の範囲

1. 内部に一对の電極を有した複数の隔壁と該隔壁毎に独立に前記一对の電極間へ電圧を印加する手段とを有することを特徴とするマイクロチャンバプレート。

2. 請求項1記載のマイクロチャンバプレートにおいて、上記一对の電極間の電気抵抗や静電容量や荷電を検知する手段を付加してなることを特徴とするマイクロチャンバプレート。

3. 請求項2記載のマイクロチャンバプレートを用いて検出された上記一对の電極間の電気抵抗や静電容量や荷電から、上記隔壁内の粒子の有無または形状を特定することを特徴とする粒子判別方法。

4. 請求項2記載のマイクロチャンバプレートに、上記一对の電極間に粒子を位置決めする手段を

付加してなることを特徴とする粒子処理装置。

5. 請求項4記載の粒子処理装置において、上記粒子を細胞としたことを特徴とする細胞処理装置。

6. 請求項5記載のマイクロチャンバプレートに、上記一对の電極間に位置決めされた細胞融合手段を付加してなることを特徴とする細胞融合装置。

7. 請求項6記載の細胞融合装置を用いて融合し培養したことを特徴とする細胞。

8. 請求項2記載のマイクロチャンバプレートに、上記隔壁内に存在する細胞に微小孔を開ける手段を付加してなることを特徴とする細胞への遺伝子導入装置。

9. 請求項8記載の細胞への遺伝子導入装置において、上記微小孔を開ける手段としてレーザ光線を用いることを特徴とする細胞への遺伝子導入装置。

10. 請求項8記載の細胞への遺伝子導入装置において、上記微小孔を開ける手段としてX線を用

特開平2-131569 (2)

いることを特徴とする遺伝子導入装置。

11. 請求項5記載の細胞処理装置における細胞を血球とし、該血球の活性度や変形能を判別する手段を付加してなることを特徴とする血球処理装置。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は細胞融合装置に係わり、特に異種の細胞を1対1に融合させるのに好適な細胞融合のためのマイクロチャンバプレートおよび粒子判別方法ならびに粒子処理装置および細胞処理装置に関する。

(従来の技術)

従来の装置は文献「昭和62年度精密工学会春季大会学術講演会論文集p.845～846」に記載のように格子状に配列した隔壁に異種細胞を1対ずつ供給して、吸引ノズルで隔壁の小さな開口部に吸引固定して、同一融合条件下で一括して融合を行っていた。

(発明が解決しようとする課題)

いる電極間の電位として測定することにより、粒子や細胞を判別することを可能とした。また、粒子や細胞を挟んだ電極間に電圧を印加することにより隔壁に処理や融合を可能とする装置や細胞融合装置を考へた。

(作用)

マイクロチャンバプレート上の隔壁に設けた一対の電極は電圧を印加することにより、電極間に存在する一対の細胞を互いに接触させたり、互いに接触した細胞膜を介して融合したり、さらには、電極間の電位の変化から融合した細胞の形状の変化を知り、融合のバルス電圧を強めたり、弱めたり調整することができる。隔壁を多数、格子状に配列したマイクロチャンバ上で、隔壁からの電極を独立な構造にすることにより、それぞれの隔壁に存在する、細胞の個体差に依存する電気融合条件を微妙に制御することが可能となるので、多数の細胞を効率良く融合させることができる。さらに、それぞれの隔壁に存在する細胞の状態を独立に把握できるため、労力を要する目視観察等の手

上記従来の技術では、多量の細胞の融合を一括して行うため、大きさや細胞膜の厚さや活性度のばらつき等の個体差のある細胞を全て確実に融合させることが困難であり、未融合細胞と融合細胞とを選別するための労力を必要とする問題があった。本発明の目的は、個体差の大きい細胞の状態をそれぞれ独立に把握し、最適な条件で融合条件を与え、多量の細胞を確実に融合することにより、さらに独立に状態を把握した細胞に遺伝子を導入することにあり、また、さらに、血球を用いてその形状等の情報から、血球の状態を把握するなど個々の細胞を個々に処理することを可能とすることにある。

(課題を解決するための手段)

上記目的を達成するため、それぞれの隔壁に独立な電極を設けて、各電極に独立に電圧等を印加したり、電極間の抵抗等を測定可能な構造の、粒子や細胞を位置決め保持するための多数の隔壁を有するマイクロチャンバプレートを用いた。また、隔壁内の粒子や細胞の運動をそれらを挟んで

度なしに、所望の細胞の配置場所を把握して抽出することが可能となるので、所望の細胞のみを確実に、しかも効率良く生成することが可能となる。また、隔壁に存在する細胞の挙動を把握しながら、レーザ光線やX線をを用いて細胞に加工を施せるので遺伝子導入等の細胞処理を容易かつ直策に行える。さらに、液体中で、細胞等を位置決めするマイクロチャンバの隔壁に、細胞を位置決め保持する際に障害となる気泡の付着の有無を判定できるので、気泡の事前除去が可能となり、細胞等の微小な粒子を信頼性の高く取扱うマイクロチャンバを提供することができる。

(実施例)

以下、本発明の実施例を第1図～第3図により説明する。第1図は本発明のマイクロチャンバプレート、第2図はマイクロチャンバプレートを用いた細胞融合装置、第3図はマイクロチャンバプレートの電極の配設パターン例である。第1図～第3図において、共通部分の番号は同一とした。

粒子として、大きさが2～100μmの細胞

を取換える場合のマイクロチャンパブレードの拡大した断面の鳥瞰図を第1図に示す。マイクロチャンパブレード901は、厚さ400 μ mのSiウノエハに異方性エッチング処理によりピッチ770 μ mの格子状の配列で形成された隔室101～103、201～203を有している。隔室101～103には一対の細胞を電気的に融合するため、異種細胞が2個ずつ吸引保持されている。なお、隔室201～203には細胞が入っていない状態を示してある。全ての隔室には、隔室103の吸引孔603と同一の構造の吸引孔が形成されている。吸引孔の下側より図示していない吸引手段を用いて吸引することにより、細胞を位置決め保持できる構造となっている。これらの細胞は、図示していない容器(第2図906)に満たされた等張液中で、図示していない搬送手段(第2図902、903)によりそれぞれの隔室に所定の数だけ移し替えられる。隔室103には一組みの電極802、803が形成され、配線101、103を経て図示していない制御系(第2図

905)につながっている。他の隔室101、102、201～203からも、それぞれ互いに独立に電極を加えたり、電位を測定できるように電極と配線11、12および20～23が制御系に接続している。

第2図は第1図に示したマイクロチャンパブレード901を用いた細胞融合装置904の外観図である。浸透圧を揃えて細胞の活性を保つための、等張液として0.5molのソルビトール液を容器906の中に入れる。異種細胞をA、Bとすると、細胞Aを搬送する手段902、細胞Bを搬送する手段903を有している。搬送手段は、マイクロチャンパブレード901の隔室に細胞AとBをそれぞれ1個ずつ移し替えるため、それぞれ隔室に対応した位置に細胞をそれぞれ1個だけ吸引する吸引座を有した構造となっている。搬送手段902、903はそれぞれx、y軸方向に移動でき、マイクロチャンパブレードの隔室に細胞を移し替えることにより、一対の細胞A、Bが位置決め保持される。各隔室に独立に設けられた電極か

らの配線は制御系905に接続されている。制御系905は、マイクロチャンパブレードの隔室内の細胞を電気的に融合させるための電圧や、細胞の状態を細胞を挟んだ電極間の電位変化として把握して、細胞の状態に応じて印加電圧を調整したり増減する等の処理を行う処理回路。搬送手段902、903を駆動してマイクロチャンパブレードに細胞を移し替える操作等を制御する回路等から構成されている。

第3図はマイクロチャンパブレードの隔室にそれぞれ独立に設けられた電極101～104、201～204、301～304、401～404と、これらの電極からの配線10～14、20～24、30～34、40～44を平面状にパターン化した例である。

次に第1図に隔室103内の細胞を例にして、電気的細胞融合の過程を述べる。搬送手段により移し替えられ、位置決めされた細胞800、801は吸引孔603からの吸引圧により、吸引孔直上で互いに接触する。一対の細胞は電極間

に長手方向を成した吸引孔603によって、互いに接触し8の字状を成し、その長手方向が電圧方向と一致するように位置決めされる。接触を保った状態で、電極間にパルス状の電圧を印加すると、電極に挟まれた一対の細胞が接触した細胞間の部分から融合し始める。融合の進行に伴って接触していた細胞は、だるま状から樽門体状を経て球状体となる。一組みの電極間の抵抗や静電容量や電荷量は、細胞の形状変化に伴って変わる。

半径 r_1 、 r_2 の細胞が融合して半径 r_3 の大きさに変化するものと仮定すると、細胞の総容量が一定であるので、次式が成立する。

$$r_1^3 + r_2^3 = r_3^3$$

接触した細胞の最大長は

$$2 \cdot (r_1 + r_2)$$

で、融合後の細胞の最大長は

$$2 \cdot r_3 = 2 \cdot (r_1^3 + r_2^3)^{1/3}$$

である。例えば、等しい半径Rの2個の細胞が接触している時の最長距離は4Rである。融合後の球体の半径は $(2)^{1/3} \cdot R = 1.26 \cdot R$ となり、最長距離は $2.52 \cdot R$ と2個の細胞が接触していた時に比べて63%と小さくなる。従って、電極間の電位変化として検出できる。

融合のためパルス状の電圧を印加した後、電極間の電位変化が始まれば、その時細胞融合が始まったことになる。細胞融合が進行して一つの球体となると、電極間の電位変化が小さくなる。従って、一对の細胞に融合用のパルス状電圧を印加した直後に、電極間の電位を測定し、その変化率を求めることにより、融合の開始点を把握することができる。細胞融合が始まるまでは、適当な間隔でパルス状電圧を加え続け、さらに、融合が始まらない時には印加するパルス状電圧を漸次昇圧して印加条件を変えることにより、細胞を融合させることができる。電位変化が現われて融合の開始が検出された後には、融合を進展させるためにパルス状電圧の印加を停止する。また、細胞の活性

が弱い場合等には、パルス状電圧の印加により細胞が破損することがあるが、この時の電位変化のモードは急激な変化の後には一定となるモードを示す。従って、融合の進展に伴って現われる様々な電位変化のモードと区別することができるので、細胞の破損時点を把握することができる。

隔壁内で1簇の細胞の破損が判明した場合には、残りの細胞が未融合のまま残って、培養時に増殖することが防ぐために、残りの細胞を破壊処理させるための高い電圧を印加する。残存細胞の有無や破壊状況も電位変化から検知できる。以上の方法により、所望の融合細胞のみを確実に残すことが可能である。なお、電極間距離を $200 \mu\text{m}$ とし、 0.5mol のソルビトール液を用いて、サラダ葉の細胞を融合させる場合には、約25V、 $150 \mu\text{s}$ のパルス状電圧を1〜数回印加するだけで細胞融合が始まり、8の字状の接触状態から、だるま状、橋円体状を経て、約2〜3分で球体状に融合が進む。

第1図、第3図における電極からの配線パターン

ン互いに交差しないので、パターンニングは簡単であるが、チャンバプレート上に形成可能な隔壁の数に限度がある。第4図は配線パターンを立体的に交差する構造にすることによって、隔壁の数に制限なしにチャンバプレート上に形成可能な場合の一実施例である。y方向の配線10、60とx方向の配線1〜7の交差点に対応して組みの電極11〜67がパターンニングされている。それぞれの電極に電圧を印加したり、電極間の電位を測定するための接続方法は、公知の2次元液晶ディスプレイや2次元MOSイメージセンサ等を駆動する方法の応用で可能である。

第5図は第4図に示した配線方法を用いたSi製のマイクロチャンバプレートを拡大した断面の鳥瞰図である。細胞を吸引位置決めする吸引孔(寸法 $10 \mu\text{m} \times 80 \mu\text{m}$)を有する細胞保持溝プレート200と、吸引孔の位置に対応して隔壁を構成している隔壁プレート201との二枚重ね構造である。重ね合わせる部分に形成した電極類を示すため、細胞保持溝プレートと隔壁プレート

とを分離した状態を示してある。Au製の厚さ 300nm の配線6、7および $10 \sim 30$ は、第4図の配線パターンと同一番号の部分に対応する。交差する配線の交差部分は SiO_2 製の絶縁層で電気的に絶縁されている。次に、隔壁37を用いて説明する。隔壁37の吸引孔300の長手方向に配線6からの電極301と配線30からの電極302が形成されている。吸引孔300の横方向には SiO_2 製の絶縁体の凸部303、304が形成されている。絶縁体の凸部303、304は吸引孔を挟んで配置されており、電極301と302との間に電圧を印加した時に生じる電気力線を吸引孔の中央で収束させる機能がある。従って、吸引孔上に接触位置決めされた一对の細胞に対して効率の良い電圧印加や測定を可能としている。

次に、一对の電極間に存在する細胞の状態や挙動を電気的に検出した実施例を第6〜8図を用いて述べる。第6図は、本発明の実施例の電極部拡大図で、電極601、602との間に異種細胞

603, 604 が互いに接触し位置決めされている状態を示している。これらの電極や細胞は等張液605に浸っている。文献(細胞工学Vol.3, No.6, 1988, p.497~505のp.500, p.502)に示されているように、0.5molのソルビトールの等張液の比抵抗は約1k Ω ・cmで、細胞間の比抵抗は約100 Ω ・cmである。通常、細胞間の厚さは約10nmであるのでその厚さ方向の抵抗は約1k Ω である。本発明の電極601と602の間隔は200 μ mで、その抵抗は約0.2k Ω である。従って、対向する電極の偏を細胞の直径より小さくするか、絶縁体(第5図の303, 304に相当)を設けて電界が細胞に集中する構造にすることによって、電極間に存在する細胞の形状に存在する抵抗を測定することが可能である。電極601と602間に電圧606から定電圧をパルス状に印加して、検出処理回路607から細胞の膜の厚さに存在する抵抗を求め表示していない例(第9図905に相当)に出力する。なお、低電圧をパルス状に

印加するのは等張液の電気分解を防ぐためである。測定処理後に得られる細胞の形状に存在する抵抗値の時間的変化の例として第7, 8図に示す。第7図は融合過程の抵抗特性を示す。また第8図は細胞の破壊過程を示す。両図とも横軸は時間 t 、縦軸は抵抗値 r を表わしている。

第7図において、細胞が電極間に存在しない時間 t_0 には等張液のみの抵抗値 r_0 (約0.2k Ω)、細胞が1個だけ位置決めされている時間 t_1 には細胞1個分の膜厚に依存した抵抗値 r_1 (約2k Ω)、細胞が2個だけ位置決めされている時間 t_2 には細胞2個分の膜厚に依存した抵抗値 r_2 (約4k Ω)、細胞融合が始まり細胞の融合が進行している時間 t_3 には、互いに接触していた部位の膜が薄くなり融合が進むに連れて抵抗値が減少し r_3 となり、その結果、雑種細胞が形成される。時間 t_4 には雑種細胞として存在している時の抵抗値 r_4 を示す。

第8図は細胞の数と破壊の有無を示す特性の一例である。時間 $t_0 \sim t_4$ までは第7図と同じであ

る。2個存在していた細胞のうち1個が破壊すると時間 t_5 と t_6 との間の変化のように抵抗値の変化は急激となる。従って、細胞融合が進行中の膜やかな抵抗値の変化(第7図 t_1 に相当)と比べて識別して処理することが可能である。時間 t_7 の抵抗値 r_7 (ほぼ r_4 に等しい)は1対の細胞のうち1個だけ破壊して、残り1個となった時の細胞の抵抗値である。さらに、残りの1個の細胞も破壊すると、時間 t_8 に示すような抵抗値 r_8 (ほぼ r_0 に等しい)となる。なお、それぞれの物質の抵抗値は電極の形状や等張液の濃度、溶解質の濃度、細胞の種類等により左右されることは明らかであるが、一度条件を求めれば、大きなばらつきはない。また、静電容量や誘電率などの電気的特性も検出処理回路の応用として考えることは容易である。

以上述べた実施例は、20~100 μ mの細胞を取扱う場合であるが、この寸法以外の細胞や粒子に対しても、マイクロチャンバプレートの間室や吸引孔を適切に設計することにより容易に応用

できることは明らかである。なお、吸引孔の μ mオーダーの加工は半導体プロセスで用いられているパターンニング技術やエッチング技術を用いることで実現できる。また、マイクロチャンバプレートの材料等は加工寸法や精度に応じて、Si以外のシリコンや樹脂やセラミクス等を用いることも可能である。

さらに、本発明で示した細胞融合装置以外に、所定数の細胞を隔室に入れてその状態を把握しながら薬品処理を行ったり、培養処理を行う等の細胞処理装置として用いることも可能である。

また、所定の遺伝子を懸濁した液の中に細胞の位置決めされたマイクロチャンバプレートを入れ、細く絞ったレーザ光線やX線を細胞壁に照射して微細孔を開け、遺伝子を細胞内に入れる遺伝子導入装置として用いることも可能である。

さらに、粒子として血球を用い、隔室に位置決めされる血球の数を計数することにより、単位体積量当たりの血球の数を計測して、血球濃度を求めることができる。また、隔室に位置決めした

特開平2-131569 (6)

血球に電圧を印加して、その電圧による形状の変形具合から、血球の変形能を求めて診断に供することのできる血球処理装置として用いることも可能である。

なお、粒子を液体中で位置決めして扱うマイクロチャンバプレートにとって、隔壁や吸引孔に気泡が付着することは粒子を操作する上で好ましくない。それぞれの隔壁の電極間の電位を予め測定することにより気泡の有無を検出し、気泡を除去したり、データ処理上の配慮をすることが可能となるので、信頼性の極めて高いマイクロチャンバを提供することができる。

〔発明の効果〕

本発明によれば、細胞や粒子の状態を種々に、独立に把握することができるので、従来、細胞の個体差が大きいため人手に頼らざるを得ず自動化することが困難であった細胞融合を、自動的に大量に行えるシステムとすることが可能となったので、細胞工学の大きな発展に寄与できる。また、マイクロチャンバプレート上の隔壁の配列は既知

であるので、隔壁内の粒子や、細胞を希釈付け管理することが容易にでき、種々の処理を施した後の粒子や、細胞の挙動を個々にコンピュータに送り込み処理するなどして、従来、不可能とされていた細胞や遺伝子工学上の追跡研究等に貢献できる。

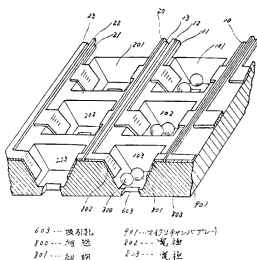
4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明の第1の実施例の拡大断面の鳥瞰図、第2図は第1の実施例の装置の外観図、第3図は第1の実施例の配線パターン図、第4図は第2の実施例の配線パターン図、第5図は第2の実施例の拡大断面の鳥瞰図、第6図は本発明の実施例の電極形状拡大図、第7図は融合過程の抵抗特性を示す図、第8図は細胞の検出過程を示す図である。

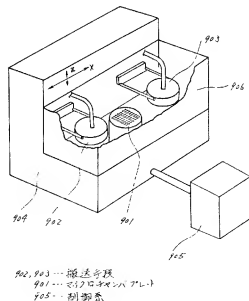
符号の説明

10～21…配線、101～203…隔壁、603…吸引孔、800、801…細胞、802、803…電極、901…マイクロチャンバプレート

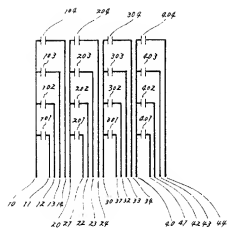
第1図



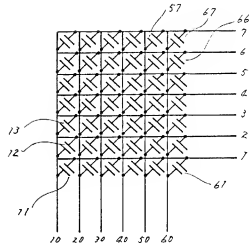
第2図



第3図

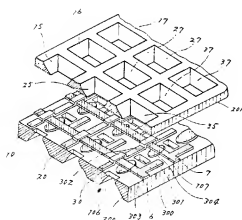


第4図



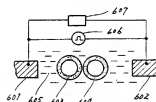
10, 20, 30, 40, 50, 60, ... Y方向の配線
1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, ... X方向の配線
10, 20, 30, 40, 50, 60, ... Y方向の配線
1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, ... X方向の配線

第5図



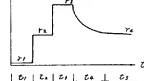
10, 20, 30, 40 ... 第1層の配線
101, 201, 301, 401 ... 第2層の配線
10, 20, 30, 40 ... 第3層の配線
101, 201, 301, 401 ... 第4層の配線
10, 20, 30, 40 ... 第5層の配線
101, 201, 301, 401 ... 第6層の配線
10, 20, 30, 40 ... 第7層の配線
101, 201, 301, 401 ... 第8層の配線

第6図

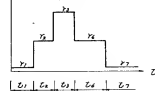


601, 602 ... 電圧
603, 604 ... 容量比較
605 ... 基準電

第7図



第8図



第1頁の続き

⑤Int. Cl.¹

識別記号

序内整理番号

C 12 N 5/10
13/00
15/02

7329-4B

G 01 N 33/48

M

7055-2C

⑥発 明 者 小 比 田 啓 之

東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内